

## INCORPORATION DE BASES PURIQUES MARQUÉES PAR LES EMBRYONS DE BATRACIENS

par

M. STEINERT\*

*Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles (Belgique)*

Nous avons émis précédemment l'hypothèse que les acides nucléiques de l'embryon de Batracien seraient formés à partir d'une réserve d'hypoxanthine et de guanine libres<sup>1</sup>.

L'objet principal de cette étude est de rechercher si les grandes quantités de bases puriques libres, que nous avons trouvées antérieurement dans les oeufs de nombreuses espèces de Batraciens, ont réellement l'importance biologique que nous leur attribuons.

L'utilisation de l'hypoxanthine pour la synthèse des nucléotides n'a été que rarement observée chez les Vertébrés et le problème présente donc un intérêt plus général.

Nous montrerons que l'adénine-8-<sup>14</sup>C et l'hypoxanthine-8-<sup>14</sup>C sont incorporées dans les nucléotides libres et les acides nucléiques de jeunes embryons de Batraciens et nous suivrons le phénomène au cours du développement.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

La membrane des oeufs de Batraciens est imperméable aux bases puriques<sup>2</sup> et l'immersion de ceux-ci dans une solution de base marquée ne peut donc donner aucun résultat. Nous avons administré les isotopes, au stade gastrula, par la technique de microinjection que nous avons utilisée précédemment<sup>2</sup>: le micromanipulateur pneumatique de Fonbrune est muni d'une micro-aiguille robuste à pointe très acérée et munie d'une perforation latérale. On ponctionne d'abord les gastrulas de façon à retirer une fraction importante du liquide blastocélien. On injecte ensuite dans le blastocèle une quantité aussi constante que possible d'une solution concentrée de la base marquée.

Les solutions d'adénine et d'hypoxanthine sont préparées dans du liquide de Holtfreter stérile et ajustées à pH 7.2 avec de la soude.

La quantité d'isotope injectée dans les oeufs est déterminée expérimentalement. Avec une micropipette jaugée, on dépose sur une plaque de cuivre une quantité de solution égale à celle qui sera injectée dans chacun des oeufs. Après dessication, l'activité est directement mesurée au compteur G.M.

Chaque gastrula de *Rana fusca* recevait une quantité d'adénine-8-<sup>14</sup>C correspondant à 100 c/m ± 17.

Les oeufs injectés ont été cultivés dans du liquide de Holtfreter stérile à la température du laboratoire. Aucune malformation n'a été observée à la suite de l'injection.

Pour apprécier la valeur des résultats, il faut tenir compte de deux causes d'erreur possibles: (a) une partie de la solution introduite dans la gastrula pourrait être rejetée avant la cicatrisation de la plaie laissée par la micro-aiguille; (b) une diffusion des bases puriques injectées dans le milieu de culture entraînerait un abaissement considérable de la concentration de l'isotope.

---

\* Adresse actuelle: Institut pour la Recherche Scientifique en Afrique Centrale, B.P. 45, Elisabethville (Congo Belge).

Nous avons donc procédé au contrôle suivant: des œufs ont été prélevés à divers moments après l'injection d'adénine marquée, lavés, puis étalés et séchés en pellicule très mince sur des plaquettes de cuivre pour en mesurer l'activité globale. Pendant quatre jours, cette activité n'a pas baissé et elle est restée égale à celle de l'adénine introduite dans la gastrula ( $192 \text{ cpm} \pm 11$  par embryon).

*Préparation des échantillons.* Les œufs (au nombre de vingt à trente cinq) sont refroidis à  $0^\circ\text{C}$ , puis broyés dans 2 ml d'acide perchlorique à  $10\%$  glacé. Après dix minutes de centrifugation, le surnageant limpide est séparé et concentré sous vide, après avoir été préalablement neutralisé à l'ammoniaque. À partir de cette fraction acidosoluble, on sépare par chromatographie les bases puriques libres, c'est-à-dire l'hypoxanthine, la guanine, les traces de l'adénine- $^{14}\text{C}$  injectée, ainsi que les nucléotides adényliques dont les valeurs  $R_F$  sont celles des acides adénosine-triphosphorique (ATP), diphosphorique et monophosphorique. Nous désignerons ci-dessous l'ensemble de ces nucléotides sous la dénomination d'ATP.

Le résidu de l'extraction à l'acide perchlorique dilué est remis en suspension dans 3 ml d'ammoniaque concentrée et chauffé en tube scellé pendant trente minutes à l'autoclave, à la pression de 1 kg/cm<sup>2</sup>. Ce procédé d'hydrolyse (SZAFARZ ET PATERNOTTE<sup>3</sup>) détruit l'acide ribonucléique (ARN) en mononucléotides, tandis que l'acide désoxyribonucléique (ADN) reste sous la forme de polynucléotides. L'ammoniaque est chassée de l'hydrolysat sous un vide partiel et le résidu est réduit à un très petit volume de liquide. Ce résidu est chromatographié une première fois pour séparer l'acide désoxyribonucléique des nucléotides adénylique et guanylique.

Ces trois constituants sont alors hydrolysés une seconde fois de façon à en détacher les bases puriques (hydrolyse de dix minutes dans  $\text{HCl } N$  à 100%). Les hydrolysats sont concentrés et les bases sont isolées par une seconde chromatographie. Ce procédé n'est pas quantitatif, mais il convient parfaitement pour effectuer une mesure précise de la radioactivité spécifique.

*Chromatographie.* Nous avons toujours utilisé le solvant suivant: propanol normal 6 part./ammoniaque concentrée 3 part./eau 1 part. Papier Whatman No. 3.

Les bases et les nucléotides sont élus des chromatogrammes avec de l'acide chlorhydrique 0.02 N (courant descendant). L'ADN est directement hydrolysé sur la bandelette de papier.

Les éluats, contenant les bases ou les nucléotides dont l'activité spécifique doit être mesurée, sont concentrés et séchés sur des lamelles de verre. L'activité est déterminée sous un compteur G.M. (Tracerlab) à fenêtre de mica mince. La lamelle de verre est alors lavée dans 4 ml d' $\text{HCl } 1/10 N$  et le spectre U.V. de cette solution est déterminé au spectrophotomètre Beckman. L'extinction à  $260 \text{ m}\mu$  permet de déterminer la quantité absolue de la base ou du nucléotide qui se trouve en solution.

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Nous appellerons activité spécifique le nombre de désintégrations compté par minute et par micromôle de substance.

*Expériences avec l'adénine-8- $^{14}\text{C}$ .* Les œufs sont prélevés 1 heure, 7 h, 24 h et 48 h après l'injection. Déjà après une heure (Tableau I), l'activité spécifique des nucléotides acidosolubles est élevée et elle ne cesse de s'accroître pendant 24 heures environ. Elle diminue à ce moment. Les acides nucléiques, qui se marquent surtout au niveau de l'acide adénylique, subissent une évolution parallèle.

TABLEAU I

### ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DE DIVERS CONSTITUANTS

(COUPS/MINUTE PAR MICROMÔLE DE LA BASE PURIQUE) APRÈS INJECTION D'ADÉNINE-8- $^{14}\text{C}$ .  
Le temps est calculé à partir de l'injection.

	1 heure	7 heures	24 heures	48 heures
ATP	3.735	7.000	30.800	20.000
ARN	1.330	3.240	16.200	12.530
Adénine		540		810
Guanine		400		620
ADN		3.100	19.500	14.800
Adénine		586		1.410
Guanine		240		608
Hypoxanthine libre				
Guanine libre	164			

La valeur de  $30.8 \cdot 10^3$  trouvée pour l'activité spécifique de l'ATP après 24 heures est extrêmement élevée, si on tient compte de l'activité spécifique de l'adénine injectée ( $429 \cdot 10^3$ ) et surtout de la teneur en ATP de la gastrula au moment de l'expérience: nous avons trouvé, par chromatographie, environ  $5 \cdot 10^3 \mu M$  d'ATP par gastrula, alors que la quantité d'adénine- $^{14}C$  injectée n'était que de  $0.75 \cdot 10^3 \mu M$ . Les résultats sont tout aussi frappants en ce qui concerne l'ARN, si l'on tient compte de la quantité élevée de cette substance au moment de l'injection (la gastrula contient environ  $5 \cdot 10^3 \mu M$  d'acide adénylique provenant de l'ARN).

L'adénine- $^{14}C$  s'incorpore également de façon massive dans l'acide désoxyribonucléique.

L'autoradiographie des chromatogrammes montre très nettement qu'après 24 heures aucune trace d'adénine radioactive libre ne peut plus être décelée, alors que l'ATP et les nucléotides des acides nucléiques manifestent une forte activité (Fig. 1).

*Expériences avec l'hypoxanthine- $^{14}C$ .* La quantité d'hypoxanthine injectée est beaucoup plus faible que celle qui se trouve normalement dans l'oeuf<sup>1</sup>.

Contrairement à l'adénine- $^{14}C$ , l'hypoxanthine injectée est donc aussitôt diluée dans une masse d'hypoxanthine non radioactive; la valeur de cette dilution doit être connue pour pouvoir apprécier les résultats de l'expérience. Nous avons donc mesuré l'activité spécifique de l'hypoxanthine libre à chacun des stades du développement (Tableau II).

TABLEAU II

ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DE DIVERS CONSTITUANTS  
(COUPS/MINUTE PAR MICROMOLE DE LA BASE PURIQUE) APRÈS INJECTION D'HYPOXANTHINE- $^{14}C$ .

	x heure	20 heures	48 heures	96 heures
ATP	200	456	980	222
ARN { Adénine	—	480	666	535
	Guanine	615	680	635
ADN { Adénine	—	—	700	500
	Guanine	—	1,000	—
Hypoxanthine libre	3,270	3,530	2,140	2,240
Guanine libre	—	120	70	173

Le temps est calculé à partir de l'injection.

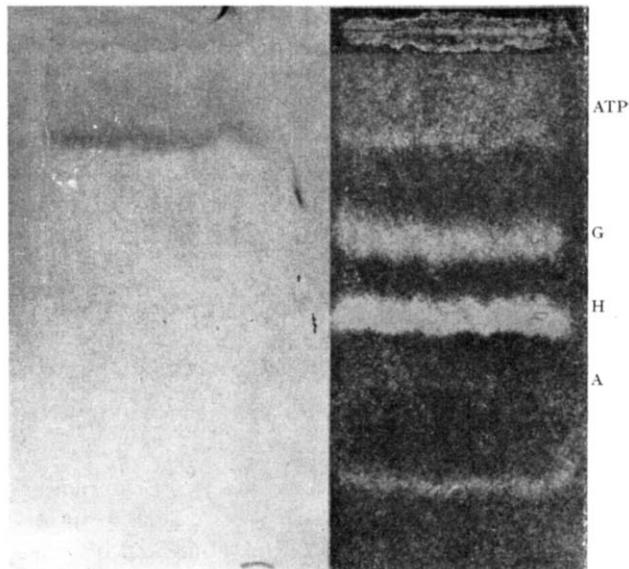


Fig. 1. Chromatogramme et son autoradiogramme (à gauche) de la fraction acidosoluble, extraite de *Rana fusca* 24 heures après l'injection d'adénine- $^{14}C$ . On constate que la quasi totalité de l'activité est concentrée à l'emplacement de l'acide adénosine triphosphorique. G: guanine; H: hypoxanthine; A: adénine.

L'activité spécifique des nucléotides solubles (ATP) et des acides nucléiques augmente pendant les quarante-huit heures qui suivent l'injection, pour diminuer rapidement ensuite.

L'incorporation de l'isotope se fait de façon relativement homogène dans tous les composés analysés; comme dans le cas de l'adénine, les acides ribonucléique et désoxyribonucléique sont à peu près également marqués.

Mais alors que l'adénine n'est qu'un précurseur médiocre des nucléotides guanyliques, l'hypoxanthine est transformée aussi bien en guanine qu'en adénine.

#### DISCUSSION

Un fait mérite de retenir particulièrement l'attention dans le cas des injections d'hypoxanthine-8-<sup>14</sup>C: l'activité observée dans les nucléotides puriques de l'ARN est précisément celle qu'on peut prédire si les bases libres de l'oeuf constituent la seule source de purines pendant les premiers stades du développement de l'embryon de Batracien. L'embryon de *Rana fusca* contient, en effet, aux stades de la jeune gastrula et à celui du bourgeon caudal respectivement 15.40 et 18.90 µg d'acide ribonucléique<sup>4</sup>. Il se produit donc une synthèse nette d'environ 3.50 µg d'ARN entre les deux stades. Si nous supposons que la synthèse des nucléotides adényliques se fait entièrement à partir du pool d'hypoxanthine (activité spécifique moyenne dans les premières 24 heures: 3,400 — voir Tableau II), l'activité spécifique de l'acide adénylique de l'ARN serait, au stade du bourgeon caudal de  $3,400 \times 3.50 / 18.90 = 630$ ; le chiffre trouvé est 666.

On ne peut pas faire le même calcul dans le cas de l'ATP et de l'acide désoxyribonucléique, parce que l'importance de leur synthèse n'est pas encore connue avec assez de précision; il est cependant probable qu'on arriverait à des conclusions similaires. Il paraît donc vraisemblable que la synthèse des nucléotides puriques de l'embryon se fait à partir d'une réserve d'oxypurines libres et que ces substances sont les seuls précurseurs, jusqu'à un stade voisin de celui du bourgeon caudal.

Le fait que l'adénine-8-<sup>14</sup>C s'incorpore beaucoup plus rapidement que l'hypoxanthine-8-<sup>14</sup>C confirme qu'elle ne participe pas au pool des oxypurines libres. Notons encore que l'adénine s'incorpore davantage dans l'ATP que dans les acides nucléiques, alors que l'hypoxanthine se répartit de façon plus homogène. Ces faits contribuent à expliquer la toxicité de l'adénine pour l'embryon de Batracien, phénomène que nous avons attribué à une inhibition compétitive<sup>2</sup>.

Nous avions observé précédemment<sup>1</sup> que le pool des oxypurines libres cesse de s'appauvrir à un stade voisin de celui du bourgeon caudal. Cette constatation est en parfaite concordance avec nos résultats actuels sur le métabolisme de l'hypoxanthine-8-<sup>14</sup>C: l'activité spécifique des nucléotides puriques baisse fortement après le stade du bourgeon caudal, bien que l'embryon contienne encore de l'hypoxanthine libre en abondance. Il serait d'ailleurs intéressant de savoir si, en présence de précurseurs radioactifs convenables (formiate, glycocolle), la gastrula est capable de synthétiser *de novo* le cycle purique.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a pu être exécuté grâce à un subside de l'Institut pour la Recherche scientifique en Afrique centrale.

Nous sommes heureux d'exprimer ici notre reconnaissance au Professeur R. MARTIN, qui nous a aidé dans la synthèse d'un échantillon d'hypoxanthine-8-<sup>14</sup>C.

## RÉSUMÉ

Des quantités connues d'adénine-8-<sup>14</sup>C et d'hypoxanthine-8-<sup>14</sup>C ont été micro-injectées dans des gastrulas de Batraciens. Ces précurseurs s'incorporent rapidement dans l'ATP et dans les acides nucléiques, mais seule l'hypoxanthine peut être transformée en guanine. Il semble donc que les acides nucléiques soient synthétisés, au début du développement embryonnaire, à partir de purines libres, en particulier à partir d'hypoxanthine.

## SUMMARY

Known amounts of adenine-8-<sup>14</sup>C and hypoxanthine-8-<sup>14</sup>C have been micro-injected into Amphibian gastrulae. Both precursors are quickly incorporated into ATP and nucleic acids, but only hypoxanthine can be converted into guanine to a large extent. It seems that free purines, especially hypoxanthine, are the natural precursors of the nucleic acids purines during early development.

## ZUSAMMENFASSUNG

Bekannte Mengen von Adenin-8-<sup>14</sup>C und Hypoxanthin-8-<sup>14</sup>C wurden ins Innere von Lurch-gastrulen mikroinjiziert. Diese Vorgänger werden schnell in ATP und in die Nukleinsäuren ein-verleibt, doch nur Hypoxanthin kann in Guanin verwandelt werden. Es scheint also, dass Nuklein-säuren am Anfang der embryonnären Entwicklung aus freien Purinen, besonders aus Hypoxanthin synthetisiert werden.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. STEINERT, *Bull. soc. chim. biol.*, 34 (1952) 923.
- <sup>2</sup> M. STEINERT, *Ann. soc. roy. zool. Belg.*, 82 (1951) 107.
- <sup>3</sup> D. SZAFARZ ET C. PATERNOTTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 1518.
- <sup>4</sup> M. STEINERT, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 549, et *thèse de Doctorat*, Université libre de Bruxelles (1953).

Reçu le 19 Mai, 1955